



ケージドセリン光分解とべん毛モーター回転計測を用いた大腸菌走化性応答の高時間分解能計測

著者	佐川 貴志
号	12
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	生博第283号
URL	http://hdl.handle.net/10097/57662

さがわ たかし

氏名（本籍地）	佐川 貴志
学位の種類	博士（生命科学）
学位記番号	生博第283号
学位授与年月日	平成26年7月16日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科，専攻	東北大学大学院生命科学研究科 （博士課程）分子生命科学専攻
論文題目	ケージドセリン光分解とべん毛モーター回転計測 を用いた大腸菌走化性応答の高時間分解能計測
博士論文審査委員	（主査） 教授 石島 秋彦 教授 高橋 聡 准教授 松井 敏高

論文内容の要旨

大腸菌はべん毛モーターの回転方向を制御することで、自らの生存に好ましい環境へと遊泳する (Fig. 1). ベん毛モーターの回転方向は走化性システムにより制御されている. 細胞極に存在する膜貫通型受容体により検出された刺激は、受容体と結合しているキナーゼ CheA の自己リン酸化活性へと変換される. CheA のリン酸基は、シグナル伝達タンパク質 CheY に転移され、リン酸化 CheY (CheY-P) が細胞質内を伝達、べん毛モーターの基部へと結合することで、べん毛モーターの回転方向は counter clockwise (CCW) から clockwise (CW) 方向へと変更される. 一方で、誘引物質が受容体に結合すると、CheA の自己リン酸化活性が抑制される. その後、脱リン酸化酵素 CheZ の働きにより細胞内 CheY-P 濃度は低下し、べん毛モーターからの CheY-P の解離がし、べん毛モーターの回転方向は CCW 方向へと変換される [1].

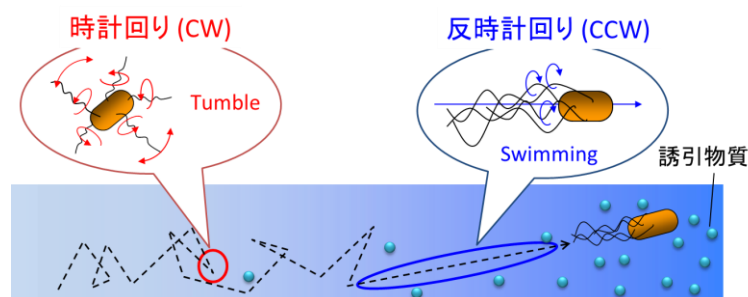


Fig. 1 大腸菌の走化性

これまで、大腸菌の誘引物質への生理応答を計測することで、誘引応答時の細胞内情報伝達について反応速度論的な解析がされてきた [2], [3]. しかしながら、誘引物質の認識が引き起こす CheY-P 濃度低下が、細胞質内を伝達される様子は明らかにされていない. そこで、本研究では誘引物質に対する細胞内情報伝達分子の細胞内動態を明らかにするために、ケージドセリンの光分解を用いて、誘引物質であるセリンを大腸菌 1 細胞に添加し、べん毛モーターの回転方向から、細胞のセリンへの応答時間、応答の持続時間をそれぞれ高時間分解能 (1255 Hz) で計測した.

セリン導入後，細胞のセリンへの応答を示す持続的な CCW 方向への回転が観測された (Fig. 2).

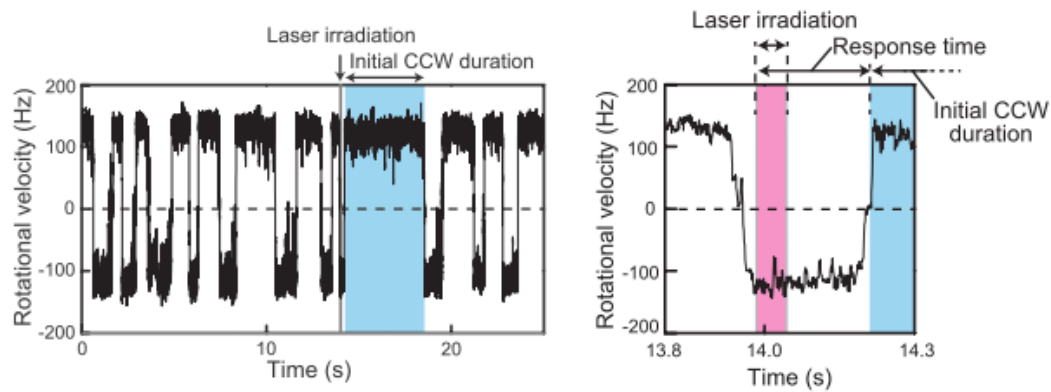


Fig. 2 放出されたセリンへの細胞応答

べん毛モーターの回転方向転換から導出した細胞のセリンへの応答に要する時間 (response time) は約 310 ms であり，セリンを導入しないコントロールの条件に比べ，有意に短い値を示した．Response time は受容体—べん毛モーター間距離の増大に応じて増大する結果が得られた (Fig. 3)．応答時間の距離依存性から見積もった拡散係数は，約 $15 \mu\text{m}^2/\text{s}$ であり，過去に報告されている CheY-P の拡散係数^{[4], [5]}と一致した．これらの結果は，誘引物質により引き起こされた CheY-P 濃度低下が，受容体の存在する極から反対の極へと方向性を持って伝達される様子を示唆しており，CheY-P 濃度低下の伝達はシグナル伝達分子 CheY, CheY-P の拡散によって引き起こされると考えられる．また，受容体—べん毛モーター間距離が 0 の時の response time は約 240 ms であった．この結果は，誘引刺激の引き起こす大腸菌の細胞内情報処理において，シグナル分子の拡散 ($\sim 50 \text{ ms}$) に要する時間に加え，走性タンパク質による酵素反応に約 240 ms の時間を要することを示している．

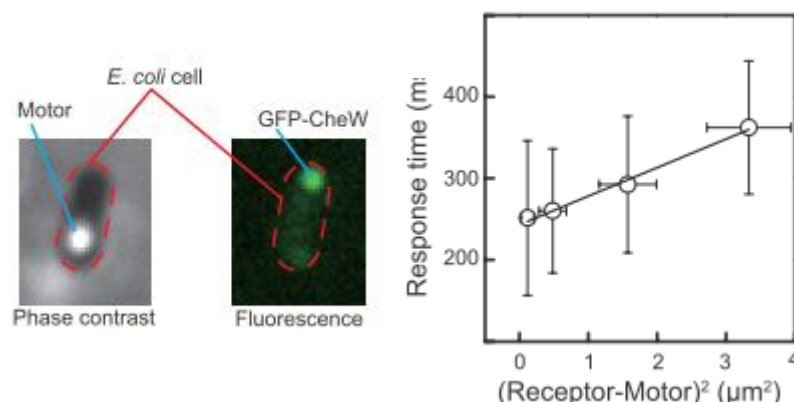


Fig. 3 応答時間の受容体—べん毛モーター間距離依存性

次に、細胞のセリン感受性を評価するために、response time, 応答の持続時間のセリン濃度依存性を評価した。Response time は放出されたセリンの濃度の増大に対して二値的に減少する結果が得られた (Fig. 4). $0.1 \mu\text{M}$ 以下のセリンを添加した場合、response time はセリンを添加しないコントロールの値と一致し、一方で、 $0.6 \mu\text{M}$ 以上のセリンを添加した場合、response time は短くなりかつ約 250 ms と一定の値を示した。応答時間のセリン濃度依存性からヒルの式を用いて、見かけの解離定数とヒル定数を導出した。見かけの解離定数は、約 $0.18 \mu\text{M}$ であり、細胞応答を引き起こすセリン濃度の閾値であると考えられる。また、ヒル定数は約 3 であり正の協同性を示した。応答時間に見られた正の協同性は、受容体間の協同的な相互作用に起因するものと考えられる^[6]。

応答の持続時間は放出されたセリン濃度に対し増大する結果が得られた (Fig. 5)。放出されたセリン濃度が $1.0 \mu\text{M}$ 以下の条件では、応答の持続時間はセリンを添加しないコントロール条件の値に一致し、一方で $1.0 \mu\text{M}$ 以上のセリンを添加した条件では、応答の持続時間はセリン濃度の増大に依存して増大する結果が得られた。応答の持続時間は約 5 s であり、細胞が数 μM のセリンに適応するために要する時間 ($\sim 120 \text{ s}$) に比べてはるかに短い値であった。したがって、細胞はセリンに適応したのではなく、細胞周囲のセリン濃度の減少を検知していると考えられる。次に、細胞周囲に放出されたセリン濃度の時間変化を数値計算的に求めることによって、細胞がセリン

への応答から復帰した際のセリン濃度を求めた．見積もられたセリン濃度は約 $0.22 \mu\text{M}$ であり，セリン濃度上昇時に求めた細胞応答を引き起こすセリン濃度の閾値とほぼ同じ値が得られた．したがって，大腸菌は $0 \mu\text{M}$ のセリン濃度に適応した状態において，約 $0.2 \mu\text{M}$ を境にセリンに応答しており，セリン濃度上昇，下降の過渡的な刺激を細胞加えた場合，細胞のセリン濃度感受性にヒステリシスが存在しないことが明らかになった．

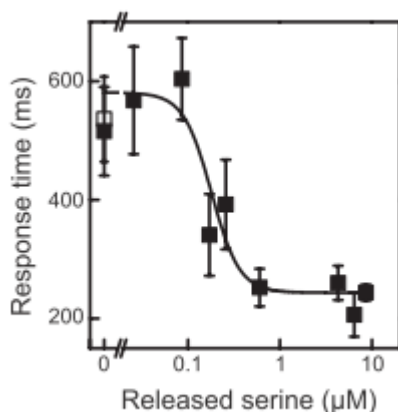


Fig. 4 応答時間のセリン濃度依

存性

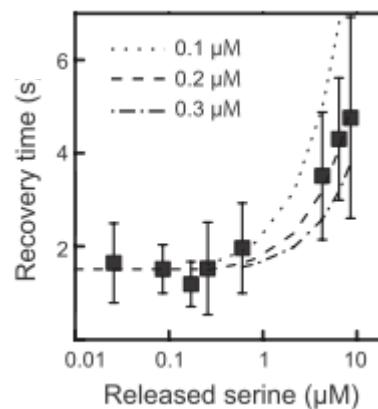


Fig. 5 応答の持続時間のセリン濃度

依存性

本研究において，大腸菌の細胞内情報伝達と誘引物質への細胞応答を1細胞レベルで定量的に計測することができた．1細胞誘引応答計測により，誘引物質の認識が引き起こす CheY-P の濃度低下がシグナル伝達分子の拡散によって方向性を持って伝播している様子が明らかになった．また，我々は大腸菌のセリン濃度上昇，下降に対する応答の閾値をそれぞれ求めることで，ある状態に適応した細胞のセリン濃度上昇，下降に対する応答の閾値は同じ値であることを示した．これらの発見は，生体内に広く保存されているシグナル伝達プロセスを，定量的に理解するための新たな展望を示すものである．

- [1] Wadhams, G. H., & Armitage, J. P., (2004), *Nature reviews. Molecular cell biology*, vol. 5, pp. 1024–37
- [2] Khan, S., (2000), *Biophysical journal*, vol. 78, pp. 2186–7
- [3] Sourjik, V., & Berg, H. C., (2002), *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 99, pp. 12669–74

- [4] Segall, J. E., Ishihara, A., & Berg, H. C., (1985), *Journal of Bacteriology*, vol. 161, pp. 51–59
- [5] Terasawa, S., Fukuoka, H., Inoue, Y., Sagawa, T., Takahashi, H., & Ishijima, A., (2011), *Biophysical journal*, vol. 100, pp. 2193–200
- [6] Bray, D., Levin, M. D., & Morton-Firth, C. J., (1998), *Nature*, vol. 393, pp. 85–8

論文審査結果の要旨

大腸菌内における受容体から各モーターへの情報の流れの役割を担う CheY は受容体からのシグナルを受け、リン酸化され (CheY-P), 各モーターの基部体構成タンパク質である FliM に結合する. その結果, モーターは反時計回り (CCW) から時計回り (CW) に回転方向を転換する. モーターが細胞外の環境の変化に対してどのように細胞が応答するかは非常に興味深いものである. 従来からも細胞外の溶液条件を変えたりした研究は行われていたが, それらは, 溶液交換などによる低い時間分解能, 多数の細胞からの情報, などまだまだ不十分であった.

そこで, 佐川貴志君は従来の計測技術に加え, ケージド化合物を新たに合成し (東北大, 金原研との共同研究), 高い時間分解能を備えた計測システムにより 1 細胞レベルでの応答を計測した. ケージド化された誘引物質であるセリンを用いて細胞周囲の誘引物質濃度をサブ秒オーダーで変化させ, その際の細胞のモーターの応答を観察した. また, 誘引物質であるセリンはモーターの回転を CW から CCW に促すため, セリンの放出はモーターが CW 回転中であることが望ましい. そこで, モーターの回転角速度, 回転方向をリアルタイムで計測し, モーターが CCW から CW に変換した際にレーザーを照射し, セリンを放出するシステムを開発した. その結果, 定常状態の CW 持続時間に比べて, セリン照射によりあきらかに短い CW 持続時間となることを確認した. また, その持続時間はモーターの位置に依存し, 極から遠くなると持続時間は長くなることを明らかにした. これは, 極からの伝搬が起こっていることを示唆している. さらに, MSD プロットにより, その拡散係数を見積もることができ, その値は従来の結果と一致した. また, 興味深いことにこの MSD プロットは原点を通らず, 約 200ms の切片を持っていた. このことは CW 持続時間には, 細胞内拡散に加えて, 極, モーター基部体での化学反応が含まれていることを示唆している. このように我々の計測により, 細胞情報に関わる化学反応, 拡散を区別して理解することに成功した. 佐川貴志君は自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有することを示している. したがって, 佐川貴志君提出の論文は, 博士 (生命科学) の博士論文として合格と認める.